

STUDI POTENSI EKSTRAK *BRUCEA JAVANICA* SEBAGAI BIOAKTIF ANTIKANKER PAYUDARA TERHADAP SEL T47D

Rina Andriyani dan Zalinar Udin

Pusat Penelitian Kimia-LIPI
Jl. Cisit - Sangkuriang Bandung 40135
e-mail : zalinarudin@yahoo.com

INTISARI

Meningkatnya penderita kanker di Indonesia dan langkanya obat untuk pengobatan pasien-pasien tersebut, memicu para ahli untuk melakukan serangkaian penelitian yang berhubungan dengan pencarian obat kanker baru. Buah makasar (*Brucea javanica*) merupakan tanaman yang diketahui memiliki aktivitas sebagai antikanker.

Pada penelitian ini akan diuji bioaktivitas antikanker ekstrak *Brucea javanica* terhadap sel kanker payudara T47D dengan metode SRB secara *in vitro*. Selain itu juga di pelajari mekanisme interaksi antara ekstrak tersebut dengan DNA yang diisolasi dari sel kanker T47D. Dalam rangka mempelajari mekanisme tersebut di atas, telah dilakukan metode "dot blotting" untuk mengamati interaksi antara molekul DNA sel kanker T47D dengan ekstrak *Brucea javanica*. Hasil interaksi dianalisis menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).

Hasil pengujian bioaktivitas antikanker, dalam menghambat pertumbuhan sel T47D menunjukkan bahwa ekstrak *Brucea javanica* memiliki aktivitas dengan IC_{50} 2,69 g/mL, sedangkan hasil interaksi antara ekstrak *Brucea javanica* dengan DNA sel yang diamati dengan KCKT terdeteksi pada waktu retensi 2,26; 3,63 dan 3,94 menit. Data ini menunjukkan bahwa diduga ketiga kandidat senyawa dengan waktu retensi tersebut yang menyebabkan adanya bioaktivitas antikanker dari ekstrak *Brucea javanica*.

Kata Kunci : Bioaktivitas antikanker, DNA sel T47D, ekstrak *Brucea javanica*, interaksi molekuler

ABSTRACT

The high level of cancer disease in Indonesia and the scarcity of anticancer drugs have encouraged many scientists to do a series of cancer drug discovery

research. Buah makasar (*Brucea javanica*) known has anticancer activity.

This research would bioassay the anticancer activity of *Brucea javanica* extract toward T47D breast cancer cell by *in-vitro* method, using SRB dyed. In order to study the mechanism, a dot blotting method was carried out to observe the interaction between the *Brucea javanica* extract with the chromosomal DNA molecule of T47D Cell Line. The interaction results were analyzed with High Performance Liquid Chromatography (HPLC) methods.

The result of anticancer activity assay toward T47D cell showed that *Brucea javanica* extract has activity with IC_{50} 2.69 g/mL, whereas, the interaction result was analyzed with High Performance Liquid Chromatography (HPLC) methods, exhibited the reduction peaks with the retention time 2.26; 3.63 and 3.94 minutes. It was concluded that the bioactive activity of *Brucea javanica* due to the presence of these candidates.

Keyword : Anticancer bioactivity, DNA of T47D cell, *Brucea javanica* extract, molecular Interaction

PENDAHULUAN

Kanker adalah suatu penyakit yang disebabkan oleh pertumbuhan jaringan yang tidak normal akibat hilangnya mekanisme kontrol sel. Ada beberapa faktor yang menyebabkan hilangnya mekanisme kontrol sel tersebut diantaranya virus dan beberapa proses fisika dan kimia termasuk reaksi radikal bebas. Akibat adanya serangan dari faktor-faktor tersebut, suatu sel normal dapat mengalami transformasi menjadi sel kanker. Sel kanker yang terbentuk dapat membelah diri dan selanjutnya membentuk sel kanker yang lain (Syarif et al., 1995).

Dewasa ini kanker masih merupakan penyakit yang mengerikan karena sifatnya yang mematikan. Jumlah penderita kanker semakin lama semakin meningkat, dan ini terjadi pula di Amerika Serikat yang diperkirakan pada tahun 1996 lebih dari 1.350.000 kasus telah didiagnosa positif kanker dengan lebih dari setengah juta pasien penderita kanker berada pada stadium lanjut (Atta-ur-Rahman et al., 1998). Di negara ini penyakit kanker merupakan pembunuh nomor dua setelah penyakit jantung pada orang dewasa dan akibat kecelakaan pada anak. Sedangkan di Indonesia data masih belum sempurna, tetapi dibeberapa rumah sakit besar, penyakit ini merupakan penyebab kematian peringkat kedua atau ketiga. Menurut WHO, penyakit kanker pada suatu saat akan menjadi masalah kesehatan utama baik di negara maju maupun di negara berkembang, termasuk Indonesia. Diperkirakan penyakit ini diderita oleh 15 orang pada setiap 100.000 penduduk dunia.

Penyakit kanker diderita oleh lebih dari 6 juta orang diseluruh dunia setiap tahunnya, satu dari lima orang Indonesia akan memiliki riwayat pernah terjangkit penyakit kanker dan satu dari tiga orang Indonesia akan meninggal akibat kanker. Meskipun telah miliaran dolar dihabiskan dalam penelitian pencarian obat kanker dalam beberapa dekade ini, tetapi kemajuan dalam rangka mereduksi angka statistik pengidap kanker masih cukup sedikit.

Menurut data Departemen Kesehatan Republik Indonesia, sampai saat ini telah ditemukan sekitar 7.500 jenis tanaman obat. Sekitar 10% di antaranya merupakan tanaman obat untuk penyakit kanker (Hariana, 2006). Namun sangat disayangkan bahwa belum dilakukan penelitian secara mendalam tentang khasiatnya dalam mencegah proses pembelahan sel kanker. Juga belum jelas cara kerja obat bahan alam ini, apakah menghambat kerja enzim atau lainnya. Sampai saat ini belum ada jamu instan yang mampu menyembuhkan penyakit kanker yang hasilnya dapat dipertanggung jawabkan secara medis atau ilmiah. Akan tetapi, yang jelas obat bahan alam ini dapat diperoleh dengan harga

murah, bermanfaat, dan efek samping yang cukup ringan, karena merupakan bahan makanan sehari-hari yang dapat dikonsumsi setiap waktu. Pemanfaatan bahan alam, khusus tumbuhan sebagai obat atau bahan baku obat merupakan salah satu alternatif penanggulangan permasalahan kebutuhan bahan baku obat di Indonesia, dimana 90% masih merupakan produk impor (Endo, A., 1987; Hariana, 2006). Penelusuran khasiat tumbuh-tumbuhan obat tradisional terhadap penyakit kanker akan memberikan nilai tambah bagi kekayaan alam Indonesia, antara lain sebagai bahan baku substitusi impor dan dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai sediaan fitofarmaka. Adanya potensi sumber daya tumbuhan obat Indonesia, juga dikaitkan dengan krisis ekonomi saat ini, maka khasiat tumbuhan obat dalam penanggulangan penyakit kanker perlu diteliti.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui ekstrak *Brucea javanica* yang memiliki potensi aktivitas biologi antikanker yang selektif terhadap kanker payudara dan juga mempelajari interaksi antara ekstrak tersebut dengan DNA yang diisolasi dari sel kanker T47D. *Brucea javanica* merupakan tanaman dari famili *Simaroubaceae*, ordo *sapindales*, divisi *angiosperms*, kingdom *plantae*. Tanaman ini digunakan bagian buahnya sebagai antikanker pada kanker kerongkongan (esofagus), lambung, rektum, paru-paru, leher rahim (serviks), dan kulit (Sumber: lptek.net). Sedangkan untuk bagian daunnya, penulis tidak menemukan penelitian yang meneliti kearah tersebut.

Penelitian yang telah dilakukan oleh Muriel Mucendet dkk (2004) juga menunjukkan bahwa senyawa *brucatol* yang terkandung dalam buah *Brucea javanica* menginduksi diferensiasi sel HL60 meliputi pengaktifan *Nuclear Factor kappa B* (NF- κ B). NF- κ B merupakan suatu protein yang mengontrol transkripsi DNA. Protein ini memegang peranan penting dalam sistem regulasi respon imun akibat infeksi. Apabila sistem regulasi NF- κ B terganggu, hal ini akan mengakibatkan timbulnya beberapa penyakit baru, diantaranya kanker. Luyengi dkk. (1996) menemukan sebuah lignan dan empat buah

terpenoid yang terkandung dalam *Brucea javanica* dan mempunyai indikasi dalam menginduksi diferensiasi sel HL60. Senyawa-senyawa tersebut diantaranya adalah *guaiacylglycerol- β -O-6'-(2-methoxy)cinnamyl alcohol ether*, *simaroubolides*, *brusatol*, *dehydrobrusatol*, *yadanzolide C*, dan *blumenol A*,

Buah *Brucea javanica* dalam pengobatan Cina, Lau dkk (2008), mengemukakan buah tersebut diperkirakan memiliki sifat antikanker dan telah terbukti memiliki aktivitas sebagai antiproliferasi dan proapoptosis pada sel kanker manusia.

Aktivitas antikanker terhadap sel murine leukemia P388, meskipun lemah ditunjukkan oleh senyawa-senyawa quassinoids yang terkandung dalam biji *Brucea javanica*. Senyawa-senyawa tersebut adalah *Javanicolides A (I)* dan *B (II)*, dan *Javanicolides A (III)* (Kim, et al., 2003).

Berdasarkan data yang diperoleh dari situs sentraipteknet mengenai Tanaman Obat Indonesia, *Brucea javanica* mengandung alkaloid (*brucamarine*, *yatanine*), glikosida (*brucealin*, *yatanoside A* dan *B*, *kosamine*), dan phenol (*brucenol*, *bruceolic acid*). Bijinya mengandung *brusatol* dan *bruceine A, B, C, E, F, G, H*. Daging buahnya mengandung minyak lemak, asam oleat, asam linoleat, asam stearat, dan asam palmitoleat. Buah dan daunnya mengandung tanin.

BAHAN DAN METODA

Bahan dan Alat

Bahan simplisia yang digunakan yaitu *Brucea javanica* (L.), diperoleh dari BALITRO-Bogor. Determinasi dilakukan di Lembaga Herbarium Bogoriense-LIPI, Bogor.

Sel kanker T47D ditumbuhkan dalam media DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) yang ke dalamnya ditambahkan NaHCO_3 0,4 %, NAA (*Non-essential Amino Acid*) 1 %, PSF (*Penicillin Sodium Fungizone*) 1,0 % dan BCS (*Bovine Calf Serum*) 1,0 %. Media diinkubasi pada CO_2 inkubator selama 3 hari (mengandung $10^7 - 10^8$ cell) (Rina, 2009). DNA cell diisolasi menggunakan DNA Easy Kit dari Invitrogen.

300 g daun kering *Brucea javanica* kering

diekstraksi dengan etanol 95 % kualitas teknis pada suhu kamar selama 3x24 jam dan dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* hingga diperoleh ekstrak etanol kering.

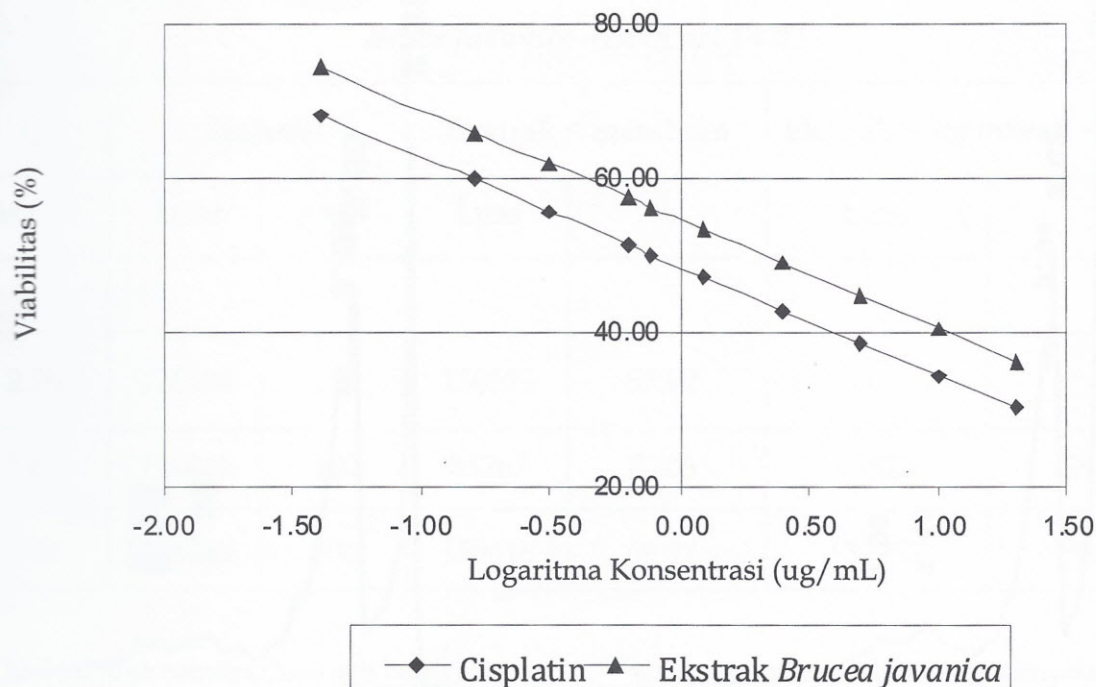
Metoda

Metoda untuk mempelajari interaksi antara ekstrak *Brucea javanica* dengan molekul DNA sel T47D, digunakan suatu metoda dot blotting. Adanya interaksi antara kedua molekul tersebut dilakukan analisis menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Alat yang dipakai untuk analisa adalah KCKT merk Hitachi L7300. Fasa geraknya menggunakan campuran metanol p.a dan air (70:30), kolomnya menggunakan kolom bundapak C - 18 yang panjangnya 30cm, kecepatan alirnya 0,8 ml/menit, panjang gelombangnya 254 nm, dan detektor yang digunakan adalah detektor uv/vis (Rina, 2009).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam uji bioaktivitas antikanker ini digunakan senyawa cis-Diammineplatinum (II) dichloride (Cisplatin) sebagai standar. Dari hasil pengamatan uji bioaktivitas antikanker seperti yang terlihat pada Gambar 1, maka diketahui bahwa ekstrak etanol tumbuhan *Brucea javanica* memiliki potensi sangat tinggi dalam menghambat pertumbuhan sel kanker payudara T47D ($\text{IC}_{50} = 2,69 \text{ g/mL}$), karena ekstrak tumbuhan tersebut memiliki IC_{50} mendekati senyawa standar antikanker cisplatin ($\text{IC}_{50} = 0,82 \text{ g/mL}$). Suatu ekstrak dinyatakan aktif dan memiliki potensi besar untuk dijadikan obat kanker apabila nilai IC_{50} -nya kurang dari 100 g/mL. Nilai tersebut menunjukkan bahwa dengan konsentrasi yang cukup kecil sudah mampu menghambat 50% pertumbuhan dari sel kanker. Tetapi bukan berarti dengan nilai IC_{50} yang sangat kecil, ekstrak tersebut semakin berpotensi. Hal tersebut dikarenakan kekhawatiran dari sifat toksisitas yang berlebih akan menyebabkan kematian pada sel jaringan yang lain, sehingga ekstrak tersebut bukan hanya menghambat pertumbuhan sel kanker tetapi juga menghambat pertumbuhan sel yang lain.

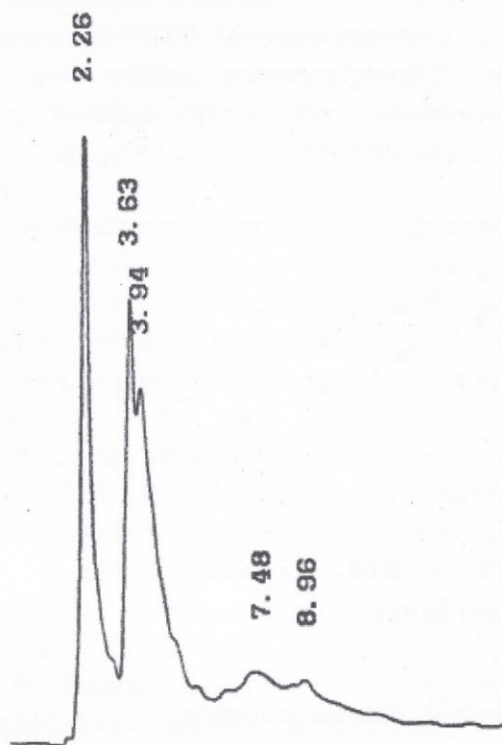
IC₅₀ Cisplatin dan Ekstrak *Brucea javanica* - Sel T47D



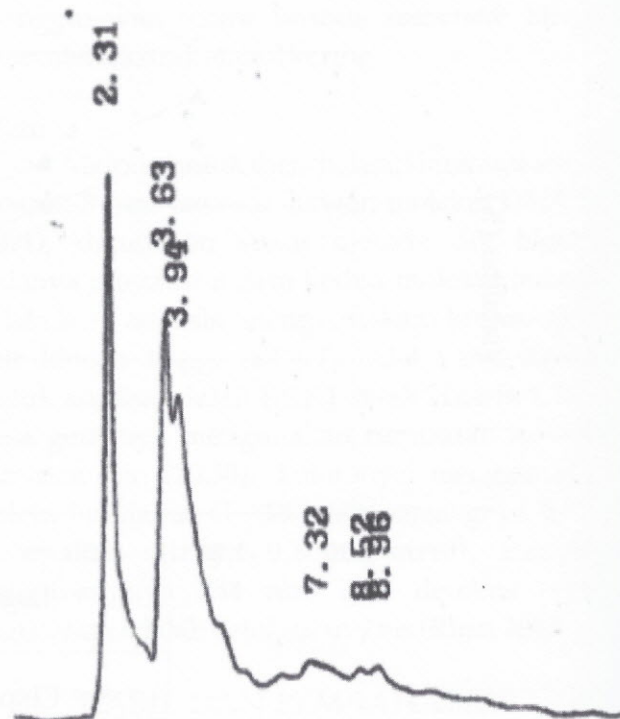
Gambar 1. IC₅₀ Cisplatin sebagai senyawa standar antikanker dan ekstrak *Brucea javanica* yang diuji menggunakan sel kanker payudara T47D

Pengamatan interaksi antara ekstrak tumbuhan dengan target molekul DNA sel T47D dilakukan dengan metode dot blotting yang dimodifikasi dari metode *Southern blotting*. Metode ini merupakan teknik pemindahan fragmen DNA yang telah dipisahkan secara elektroforesis dan didenaturasi dari gel ke suatu membran sebagai tempat pengikatan DNA. Pada penelitian ini, membran yang digunakan adalah membran nilon Hybond⁺, dan fiksasi DNA pada membran dilakukan dengan sinar UV. Setelah DNA terfiksasi dengan baik pada membran, maka DNA diinteraksikan dengan ekstrak tumbuhan dengan cara memasukkan membran berisi DNA yang sudah diterapkan pada reagen interaksi ke dalam larutan ekstrak. Adanya interaksi dapat diketahui dari perubahan puncak kromatogram larutan ekstrak tumbuhan sebelum interaksi dan sesudah interaksi.

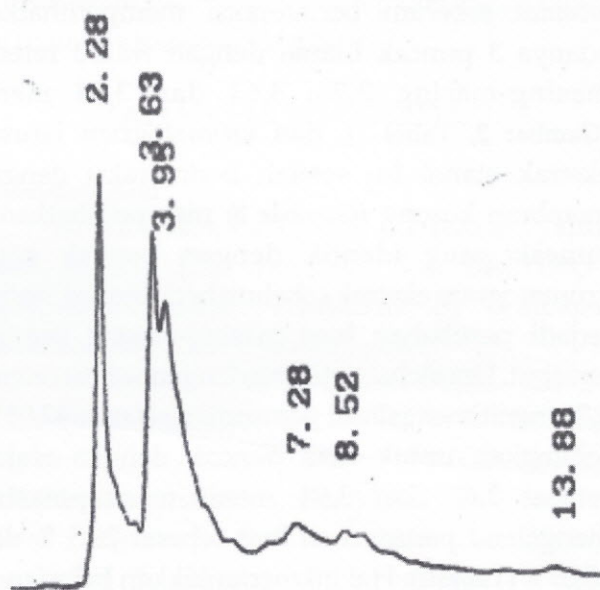
Kromatogram larutan ekstrak etanol *Brucea javanica* sebelum berinteraksi memperlihatkan adanya 3 puncak utama dengan waktu retensi masing-masing 2,26; 3,63 dan 3,94 menit (Gambar 2, Tabel 1), dan kromatogram larutan ekstrak etanol ini setelah berinteraksi dengan membran kosong (Gambar 3) memperlihatkan 3 puncak yang identik dengan puncak pada kromatogram ekstrak sebelum berinteraksi, hanya terjadi perubahan luas masing-masing puncak tersebut. Untuk luas puncak dengan waktu retensi 2,26 menit mengalami penurunan sebesar 42,08%, sedangkan untuk luas puncak dengan waktu retensi 3,63 dan 3,94 menit masing-masing mengalami penurunan luas sebesar 29,5 % dan 30,03% (Tabel 1). Hal ini menunjukkan bahwa ada kemungkinan ketiga kandidat senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol *Brucea javanica* berikatan dengan membran.



Gambar 2. Kromatogram ekstrak etanol *Brucea javanica* sebelum diinteraksikan dengan membran yang mengandung DNA. T47D.



Gambar 4. Kromatogram ekstrak etanol *Brucea javanica* setelah diinteraksikan dengan membran yang mengandung DNA T47D.



Gambar 3. Kromatogram ekstrak etanol *Brucea javanica* setelah diinteraksikan dengan membran.

Kromatogram larutan ekstrak etanol *Brucea javanica* setelah diinteraksikan dengan DNA sel T47D ternyata memperlihatkan pola kromatogram yang berbeda, bila dibandingkan dengan kromatogram ekstrak *Brucea javanica* sebelum diinteraksikan ataupun dengan kromatogram *Brucea javanica* setelah direaksikan dengan membran kosong (Gambar 4), yaitu terjadi penghilangan puncak kromatogram dengan waktu retensi 2,26 menit. Sedangkan hal yang sama terjadi untuk puncak kromatogram 3,63 dan 3,94 menit, yaitu adanya perubahan luas masing-masing kromatogram. Untuk luas puncak dengan waktu retensi 3,63 serta 3,94 menit mengalami penurunan sekitar 41% (Tabel 1).

Tabel 1. Luas dan % kromatogram hasil interaksi ekstrak *Brucea javanica* dengan DNA sel T47D

<i>Brucea Javanica</i> - DNA sel T47D						
t_R	Ekstrak		Ekstrak + membran		Ekstrak + membran + DNA	
Menit	Luas	%	Luas	%	Luas	%
2.26	225434	100	130575	57.92	-	-
3.63	118865	100	83267	70.05	69822	58.74
3.94	228135	100	159618	69.97	135972	59.60

Hal ini juga memberikan arti bahwa ketiga kandidat senyawa tersebut berinteraksi dengan DNA sel T47D. Jika kromatogram ini dibandingkan dengan kromatogram larutan ekstrak etanol *Brucea javanica* yang diinteraksikan dengan membran kosong, maka akan terlihat tidak ada perubahan pola kromatogram. Data ini mempunyai arti bahwa ekstrak etanol brucea tidak hanya berinteraksi dengan membran, tetapi juga berinteraksi dengan DNA.

Jika dilihat dari besarnya penurunan luas puncak ketiga kandidat senyawa yang terkandung di dalam ekstrak etanol *Brucea javanica* menunjukkan bahwa kandidat senyawa dengan waktu retensi 2,26 menit lebih baik berikatan dengan DNA sel T47D. Hal ini ditandai dengan bergesernya nilai t_R puncak kromatogram dari kandidat senyawa tersebut, sedangkan kandidat senyawa dengan waktu retensi 3,63 menit dan 3.94 menit masing-masing hanya memberikan penurunan luas puncak kromatogram 40% sampai dengan 41%. Data ini menunjukkan bahwa diduga ketiga kandidat senyawa dengan

waktu retensi tersebut yang menyebabkan adanya bioaktivitas antikanker dari ekstrak *Brucea javanica*.

Reseptor metabolit sekunder aktif biologi (obat) adalah komponen makromolekular tubuh yang berinteraksi secara kimiawi dengan molekul obat yang menyebabkan perubahan fisiologis. Komponen yang paling penting dalam reseptor obat ialah protein dan asam nukleat (DNA/RNA). Fungsi DNA sebagai pembawa informasi genetik merupakan dasar pemilihan DNA sebagai target utama yang berinteraksi dengan obat, karena kemampuannya untuk mengganggu proses transkripsi serta replikasi DNA sebagai tahap utama dalam proses pertumbuhan dan perkembangan sel. Mekanisme terjadinya penghambatan pertumbuhan sel adalah karena hilangnya stabilitas struktur DNA dari sel tersebut (Kensal, et. al., 1998). Hilangnya stabilitas struktur DNA ini dapat terjadi karena dua hal yaitu pemisahan struktur helik DNA yang disebabkan oleh pemanasan, dan interkalasi molekul planar ke dalam struktur helik DNA.

KESIMPULAN

1. Ekstrak etanol *Brucea javanica* menunjukkan adanya bioaktivitas antikanker payudara yang ditunjukkan dengan $IC_{50} = 2,69$ g/mL terhadap sel kanker payudara T47D
2. Interaksi antara kandidat senyawa yang terdapat dalam ekstrak etanol *Brucea javanica* dengan DNA sel T47D, ditandai dengan bergesernya puncak kromatogram yang mempunyai waktu retensi 2,26 menit, serta adanya perubahan luas puncak kromatogram 3,63 dan 3,94 menit yang mencapai 41%
3. Bioaktivitas antikanker ekstrak *Brucea javanica* ini diduga disebabkan oleh ketiga kandidat senyawa yang terkandung di dalam ekstrak *Brucea javanica*, khususnya kandidat senyawa dengan waktu retensi 2,26 menit.

DAFTAR PUSTAKA

1. Atta-ur-Rahman & M.I. Choudary, 1998, *New Trends in Natural Product Chemistry*, Harwood Academic Publishers, Switzerland, pp. 79-94.
2. Cuendet, Munel, Juell J.Gills and John M.Zzoto, 2004, Brusatol-induced HL-60 cell differentiation involves NF-kB activation, *Cancer letters* 206; 43-50.
3. Endo, A., 1987, *International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics*, 31 : 257-267.
4. Hariana, A., 2006, *Tanaman Terpilih untuk Pengobatan Berbagai Jenis Kanker*, Seri Agrisehat, Tumbuhan Obat dan Khasiatnya, Seri 1, 2, dan 3, Penebar Swadaya.
5. http://www.iptek.net.id/ind/pd_tanobat/view.php?mnu=2&id=208,
6. Kensal, E. van Holde, W. C. Johnson, and P. S. Ho, 1998, *Principles of Physical Biochemistry*, Printice-Hall, Inc., Upper Saddle River, New Jersey, 122-123.
7. Kim, I.H., Suzuki R., Hitotsuyanagi, Takeya, 2003, *Three Novel Quasinoids, Javanicolides A (I)*

- and B (II) and Javanicoside A (III) From Seeds of Brucea javanica*, *Tetrahedron* 59; 50, 9985-9989, Sch. Pharm, Univ Pharm Life.
8. Lau, Sin Ting, Zhi-Xiu Lin, Ming Zhao and Po Sing Leung, 2008, *Brucea javanica* Fruit Induces Cytotoxicity and apoptosis in Pancreatic Adenocarcinoma Cell lines, *Phytotherapy research*, *Phyther. Res.* 22; 477-486, DOI.10.1002/ptr-2344.
9. Luyangi, Lumanadio, Nanjoo Suh, Harry H.S.Fong, John M. Pezzuto, and A. Douglas Kinghorn, *A Lignan And Four Terpenoids From Brucea Javanica That Induce Differentiation With Cultured HL-60 Promyelocytic Leukemia Cells*, *Phytochemistry*, Vol. 43, No. 2, pp. 409-412.
10. Rina, A., Zalinari Udin, Vienna Saraswati, Ratnaningsih, 2009, Pusat Penelitian Kimia-LIPI, *Laporan Penelitian dan Pengembangan Senyawa Potensial untuk Penyakit Kanker Payudara, Prostat dan Kulit dari Tumbuhan Indonesia*.
11. Syarif, A. 1995. *Farmakologi dan Terapi*, Jakarta, Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, edisi-4.